

АНОТАЦІЯ

Безрук І. В. Експериментальне обґрунтування підходів та стандартизація препаратів плюща звичайного. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 226 «Фармація, промислова фармація». – Національний фармацевтичний університет, МОЗ України, Харків, 2020.

Дисертаційна робота присвячена обґрунтуванню та розробці методик для стандартизації препаратів, що містять екстракт листя плюща звичайного; оцінці розроблених методик за аналітичною точністю, відповідністю принципам «зеленої хімії» та економічною собівартістю проведення аналізу; дослідженню компонентів листя *Hedera helix*, визначення маркерів для стандартизації та дослідженню параметрів навколишнього середовища, які впливають на акумуляцію речовин; аналізу хімічного складу для визначення основних речовин-маркерів з метою стандартизації різних препаратів плюща звичайного та входного контролю сировини.

Для визначення можливих маркерів для стандартизації та дослідження впливу кліматичних умов на їх накопичення в сировині плюща звичайного було зібрано зразки в європейських країнах з різним кліматом (Австрія, Греція, Італія, Литва, Польща, Словаччина, Угорщина, Україна, Чехія).

Для попереднього скринінгу речовин у сировині *H. helix* використовували методику ВЕРХ з діодно-матричним детектором. Для розділення речовин використовували колонку АСЕ С 18 (250×4,6 мм), як рухому фазу А використовували 0,1 % розчин оцтової кислоти та як рухому фазу Б – ацетонітрил *P*. Для методики визначалися метрологічні параметри, а саме: лінійність, правильність, специфічність, межі визначення та кількісного визначення. За допомогою запропонованої методики було ідентифіковано тритерпенові сапоніни, флавоноїди та фенольні кислоти. З 9 фенольних кислот більшість були похідними гідроксикоричної кислоти, а

саме: неохлорогенова кислота, хлорогенова кислота, корична кислота, кофейна кислота, 3,5-дикофеїлхінна кислота, 3,4-дикофеїлхінна кислота, криптохлорогенова кислота та 4,5-дикофеїлхінна кислота. Крім того, було знайдено похідну тригідроксибензойної кислоти – галову кислоту. Вміст цих речовин значно варіювався в усіх досліджених зразках. Хлорогенова та 3,5-дикофеїлхінна кислоти були переважаючими сполуками у фенольних профілях усіх випробовуваних зразків листків плюща, їх кількість значно варіювалась від $(325,796 \pm 10,062)$ мкг/г до $(8630,058 \pm 12,517)$ мкг/г і від $(450,013 \pm 21,562)$ мкг/г до $(23866,566 \pm 863,267)$ мкг/г відповідно. У більшості досліджених зразків вміст 3,5-дикофеїлхінної кислоти переважав такий хлорогенової у 1,5-18 разів.

Флавоноїдний профіль складався з флавонолів (рутин, гіперозид, ізокверцитрин, кверцетин та кемпферол) та флавонів (апигенін 7-глюкозид, апигенін, лютеолін та 6-7-дигідроксиізофлавоон). Гіперозид та апигенін 7-глюкозид були домінантними флавоноїдами, вміст яких варіювався залежно від місця збору від $(45 \pm 1,2)$ мкг/г до $(4750,9 \pm 7,6)$ мкг/г і від $(113,3 \pm 0,7)$ мкг/г до $(1918,2 \pm 17,2)$ мкг/г відповідно.

Тритерпенові сапоніни були представлені гедеракозидом С, α -гедерином, гедерасапоніном В та гедеракозидом D, а їх концентрації розташовувалися в такому порядку: гедеракозид С > гедеракозид D > α -гедерин > гедерасапонін В. Зазначений профіль був характерний для усіх зразків, крім зразків, зібраних у Сіракузах (Італія), що не містили гедерасапоніну В. Вміст гедеракозиду С коливався від 3807,7 (м. Сіракузи. Італія) до 79737,3 мкг/г (м. Варшава. Польща). Ця речовина була домінантною в усіх зразках, її вміст становив від 31 до 88 % від загальної кількості ідентифікованих тритерпенових сапонінів.

Для додаткового підтвердження ідентифікованих речовин була використана хромато-мас-спектрометрія (ВЕРХ). Вдалося підтвердити наявність всіх речовини, які були знайдені при застосуванні ВЕРХ-методики.

Базуючись на загальноприйнятих даних наукової літератури щодо фармакотерапевтичних властивостей БАР плюща, основним маркером для стандартизації препаратів та вхідного контролю сировини визначено гедеракозид С. Крім того, за результатами проведених досліджень як додаткові маркери активності, що значною мірою можуть впливати на ефективність препаратів плюща, запропоновано кислоти хлорогенову та гіперозид. Ці речовини були знайдені у досить високих кількостях у всіх досліджуваних зразках листя плюща. Тому саме вміст гедеракозиду С, кислоти хлорогенової та гіперозиду запропоновано нормувати для вхідного контролю сировини на виробництві.

За допомогою ВЕРХ/АВТS методу з постколонковою дериватизацією було вивчено антиоксидантні властивості досліджуваних речовин *in vitro*. Вивчені компоненти характеризували від 85 до 97 % загальної активності у випробовуваних зразках. Найбільший вклад в антиоксидантну активність (до 80%) за експериментальними даними чинили 3,5-дикофеїлхінна та хлорогенова кислоти. Інші речовини, що виявили антиоксидантну дію, можна розташувати у такому порядку: 3,4-дикофеїлхінна кислота < гіперозид < неохлорогенова кислота.

Крім того, було визначено склад амінокислот за допомогою методу ГХ з мас-детектором після попередньої дериватизації зразків з реагентом MTBSTFA (N-трет-бутилдиметилсиліл-N-метилтрифторацетамід). Вміст та склад амінокислот у досліджуваних зразках був різноманітним та залежав від місця збору. Тільки аланін знаходився в усіх зразках. Аланін та пролін були як правило домінантними сполуками, в менших кількостях були виявлені валін, ізолейцин, лейцин, 4-аміномасляна кислота та серин. Кількість аланіну та проліну варіювалася від 0,7 до 14,4 мкг/г і від 0,8 до 16,4 мкг/г відповідно. Лейцин та 4-аміномасляна кислота були знайдені лише в деяких зразках. Найбільший загальний вміст амінокислот (36,72 мкг/г) був знайдений у зразку з Науйої-Акмяне (Литва). Найбільша різноманітність (щонайменше 6 амінокислот) було знайдено в листках з литовських міст Науйої-Акмяне,

Клайпеди, Плунге та Шілюте. Оскільки вміст амінокислот склав менше 1 % від загального вмісту БАР, використання цієї групи речовин як маркерів є недоцільним.

Уперше здійснено кореляційний аналіз впливу факторів навколишнього середовища (тип клімату, висота над рівнем моря, тип ґрунту, кількість опадів, кількість сонячних годин) на накопичення груп біологічно активних речовин у досліджуваних зразках листків плюща. За результатами досліджень висота над рівнем моря та кількість опадів були факторами, що не чинили значного впливу на накопичення всіх груп БАР.

Накопичення тритерпенових сапонінів статистично достовірно (помірно негативно) залежало від тривалості сонячного світла, типу ґрунту та типу клімату. Оптимальними визначено такі показники — кількість сонячних годин 1600-1800 на рік, ґрунт лувізол та помірно вологий клімат (тип Dfb за класифікацією Кеппена). Подібні закономірності виявлено і для флавоноїдів за винятком того, що оптимальним типом ґрунту виявився альбувезол. На накопичення фенольних кислот серед усіх факторів впливав лише тип ґрунту, найбільший вміст БАР цієї групи виявлено у зразках рослин, що зростали на ґрунті лувізол. Загальний вміст амінокислот залежав здебільшого від клімату та кількості сонячних годин. Загальний вміст БАР у зразках, що були зібрані в північних регіонах Європи був вищим, ніж у зразках з південних регіонів. Найбільш перспективною для фармацевтичного виробництва виявилась сировина з Литви та Польщі.

Порівняльний хімічний аналіз препаратів плюща звичайного полягала у визначенні аналогічних компонентів у досліджуваних зразках застосовуваних препаратів плюща звичайного (сиropи «Геделікс», «Гелітуспан», «Гедерин», «Проспан», «Гербіон», краплі «Геделікс», таблетки «Проспан»), а також оригінальних композицій, що знаходяться у розробці Житомирської фармацевтичної фабрики Vishpha® - сироп «Гедерин+» та капсули «Гедерин». У дослідженні використовувався ВЕРХ-метод з діодноматричним детектором, аналогічно тому, що й для аналізу рослинної

сировини *H. helix*. Застосований метод дозволив визначити 20 компонентів (зокрема 4 тритерпенових сапонінів, 6 флавоноїдів та 10 фенольних кислот). Крім лікарських препаратів *H. helix*, проводилися дослідження сухих екстрактів листя плюща звичайного (виробник «Martin Bauer Group», Німеччина).

Профілі обох екстрактів були однаковими, за винятком галової кислоти, що була відсутня у другому екстракті. Проте кількісний вміст компонентів відрізнявся. Серед усіх речовин вміст кемпферолу характеризувався найбільшим відхиленням (понад 135,28 %), тоді як вміст гедеракозиду С – найменшим (7,18 %). Кількісні відмінності можна пояснити різницею походження, технологією виробництва екстракту та процесу сушіння сировини. Профілі БАР усіх лікарських препаратів були схожими на профілі комерційних сухих екстрактів. Профіль тритерпенових сапонінів складався з гедеракозиду С, гедеракозиду D, α -гедерину та гедерасапоніну В, їхній сумарний кількісний вміст складав понад 80 % від загального вмісту всіх визначених речовин у кожному зразку. Переважно концентрації тритерпенових сапонінів розташовувалися у такому порядку: гедеракозид С > гедеракозид D > α -гедерин > гедерасапонін В. Профіль фенольних кислот був представлений галовою, неохлорогеновою, хлорогеновою, коричною, кофейною, 3,5-дикофеїлхінною, 3,4-дикофеїлхінною, 4,5-дикофеїлхінною, криптохлорогеновою кислотами. Переважно всі вони були знайдені в кожному зразку, за винятком галової, коричневої та кофейної кислот. Середні концентрації всіх кислот значно варіювалися. Хлорогенова та 4,5-дикофеїлхінна кислоти мали найвищі значення вмісту, які становили близько 60 % від загального вмісту фенольних кислот. Профіль флавоноїдів складався з рутину, гіперозиду, ізокверцитрину, 6-7-дигідроксиізофлавонолу, кверцетину, кемпферолу, нікотифлорину. Гіперозид був знайдений у всіх зразках. Рутин та ізокверцитрин не були виявлені лише у сиропі «Гедерин+».

Для усіх зразків була проведена оцінка антиоксидантної активності. Визначені речовини були відповідальними за 92–100% від загальної

антиоксидантної активності. Серед компонентів, що спричиняли найбільший вклад у активність, слід відзначити неохлорогенову та хлорогенову кислоти, а також гіперозид, що були присутні майже в кожному зразку і мали високі показники активності *in vitro*. Крім того, виражену активність мали 3,4-дикофеїлхінна та 4,5-дикофеїлхінна кислоти, однак вони були знайдені лише в сухих екстрактах, капсулах та краплях від кашлю.

Отримані результати також підтвердили, що, крім основного маркера гедеракозиду С, для стандартизації продуктів *H. helix* можливе використання додаткових маркерів, а саме хлорогенової кислоти та гіперозиду. Ці речовини були знайдені у достатній кількості як у сировині, так і в препаратах плюща звичайного. Крім того, фармакологічні дослідження підтверджують їх значний вплив на ефективність.

В рамках проведення фармацевтичної розробки для стандартизації капсул «Гедерин» та сиропу «Гедерин+» було розроблено ВЕРХ, УВЕРХ та ВЕТШХ методики визначення гедеракозиду С. Кожну методику було валідовано за такими параметрами: специфічність, лінійність, правильність, прецизійність, стабільність, а також було розраховано межі виявлення та кількісного визначення. Всі методики відповідали вимогам, що висуваються ДФУ, тому всі вони можуть бути використані для контролю якості продуктів плюща звичайного. Уперше здійснено порівняльну оцінку розроблених методик за аналітичною точністю, впливом на навколишнє середовище та собівартістю. Встановлено, що методи ВЕРХ та УВЕРХ мали менший вплив на екологію порівняно з ВЕТШХ методом. Поряд з тим, вартість застосування ВЕТШХ методики була в 2,3 та 1,6 рази меншою порівняно з ВЕРХ та УВЕРХ відповідно. Серед розроблених методів можна виділити УВЕРХ метод, оскільки він був дешевшим за ВЕРХ у 1,44 рази, а також більш екологічним, ніж ВЕТШХ, маючи при цьому високу точність.

Оскільки до складу сиропу «Гедерин+» крім рослинного екстракту входить сальбутамолу сульфат, здійснено розробку методик для кількісного визначення цього АФІ та визначення супутніх домішок. Розроблені методики

контролю якості сиропу «Гедерин+» використано при дослідженні стабільності лікарської форми протягом 24 місяців. Одержані результати підтверджують відповідність нормованих параметрів вимогам специфікації під час зберігання.

Ключові слова: *Hedera helix* (плющ звичайний), контроль якості, стандартизація, речовини-маркери, хроматографічні методи, антиоксидантна активність, вивчення стабільності, сировина.

Список публікацій здобувача:

1. Bezruk I., Kotvitska A., Korzh I., Materiienko A., Gubar S., Budanova L., Ivanauskas L., Vyshnevsky I., Georgiyants V. Combined Approach to the Choice of Chromatographic Methods for Routine Determination of Hederacoside C in Ivy Leaf Extracts, Capsules, and Syrup. *Sci. Pharm.* 2020. № 88 (24) <https://doi.org/10.3390/scipharm88020024> (особистий внесок – підготовка зразків для аналітичних досліджень, участь у проведенні експериментальних досліджень, участь у написанні статті).

2. Bezruk I., Georgiyants V., Ivanauskas L. Comparison of components profile in herbal raw material, extract and pharmaceuticals of *hedera helix*. «*ScienceRise: Pharmaceutical Science*». 2020. Vol. 4 (26). P. 36-39 (особистий внесок – участь у плануванні та проведенні експерименту, обробці та узагальненні результатів, участь у написанні статті).

3. Bezruk I. V., Grudko V.O., Georgiyants V.A., Ivanauskas L. Screening of the antioxidant activity of extracts from *Hedera helix* leaves using the HPLC/ABTS method. *Clinical pharmacy.* 2020. Vol. 24 (3). P. 47—52 (особистий внесок підготовка рослинної сировини для аналізу, проведення експериментальних досліджень, участь у написанні статті).

4. Bezruk I., Marksa M., Georgiyants V., Ivanauskas L., Raudone L.. Phytogeographical profiling of ivy leaf (*Hedera helix* L.). *Industrial Crops and Products.* 2020, 154, 10.1016/j.indcrop.2020.112713 (особистий внесок

підготовка рослинної сировини для аналізу, проведення експериментальних досліджень, участь у написанні статті).

5. Безрук І. В., Матерієнко А. С., Губарь С. М., Георгіянц В. А., Л. Іванаускас. Спосіб визначення гедеракозиду С методом високоефективної рідинної хроматографії з попереднім застосуванням твердофазної екстракції в складі комбінованих лікарських форм: пат. України на корисну модель № u201905811 від 27.05.2019. (особистий внесок – участь у патентному пошуку, плануванні та проведенні експериментальних досліджень та оформленні матеріалів).

6. Bezruk I. Myhal A., Kushniruk V., Georgiyants V. Development of the HPLC method for related impurities determination of active pharmaceutical ingredients in the process of the industrial synthesis. Book of abstracts dedicated to the 80th anniversary of the museum of history of lithuanian medicine and pharmacy «The 8th International Conference on Pharmaceutical Sciences and Pharmacy Practice» December15. – Kaunas, Lithuania, 2017. P. 46-47

7. Безрук І. В., Матерієнко А. С., Георгіянц В. А. Розробка методики кількісного визначення сальбутамолу сульфату методом високоефективної рідинної хроматографії. Всеукраїнський медичний журнал молодих вчених ХИСТ. – 2–6 квітня, 2018, Чернівці .Вип. 20. С. 416.

8. Безрук І. В., Матерієнко А. С, Губарь С. М., Георгіянц В. А. Обґрунтування використання високоефективної рідинної хроматографії в процесно-аналітичній технології при виробництві субстанції сальбутамолу сульфату. Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю, присвяченої 80-річчю з дня народження доктора фармацевтичних наук, професора О. М. Гайдукевича «Синтез і аналіз біологічно активних речовин і лікарських субстанцій»(Харків, 12- 13 квітня 2018р.).НФаУ, 2018. С.318-319.

9. Bezruk I. V., Materienko A. S., Gubar S. N., Georgiyants V. A. The justification of approaches to related substances control in the pharmaceutical technology of active pharmaceutical ingredients. Abstracts of XXV International

Scientific and Practical Conference of young scientists and student «Topical issues of new drugs development»(Kharkiv, 18- 20 April 2018). NUPh, 2018. P.85-86

10. Bezruk I., Myhal A., Kushniruk V., Georgiyants V. Using of the HPLC method for quantitative determination of active pharmaceutical ingredients in the process of the industrial synthesis. Book of abstracts Chemistry Conference for Young Scientists «ChemCys 2018» February 21-23, Blankenberge, Belgium, 2018. P.41

11. Bezruk I., Marksa M., Materiienko A., Gubar S.,Georgiyants V., Ivanauskas L. HPLC and HPTLC methods for the hederacoside C determination in leaves of *Hedera helix* L., dried extract and some dosage forms. Book of abstracts dedicated to the 100th anniversary of independent Lithuania's pharmacy «The 9th International Conference on Pharmaceutical Sciences and Pharmacy Practice» November 9. – Kaunas, Lithuania, 2018. P. 97

12. Straigyte E., Bezruk I., Marksa M. Marksiene R. Evaluation of polyphenol compounds and antioxidant activity in ivy (*Hedera Helix* L.) leaves. Topical issues of new medicines development: матеріали XXVI Міжнародної науково-практичної конференції молодих учених та студентів (10-12 квіт. 2019 р., м. Харків). – Харків: НФаУ, 2019. С. 101-102.

13. Bezruk I. V., Materiienko A. S., Gubar S. M., Georgiyants V. A. Development of assay method for simultaneous determination of salbutamol sulfate and potassium sorbate in dosage form. XIII науково-практична конференція з міжнародною участю управління якістю в фармації. – Харків: НФаУ, 2019. С. 15-16.

14. Bezruk I. V., Marksa M., Materiienko A. S., Georgiyants V. A., Ivanauskas L. The investigation of antioxidant activity of *hedera helix* l. components using HPLC post column ABTS method. Сучасна фармація: історія, реалії та перспективи розвитку Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю, присвяченої 20-й річниці заснування Дня фармацевтичного працівника України у 2 томах (19-20 вересня 2019 р., м. Харків). Харків, 2019. С. 309-311.

15. Bezruk I. V., Georgiyants V. A., Ivanauskas L. Quality control of ivy leaf, its extracts and dosage forms in industrial manufacturing with usage hplc and hptlc methods. Матеріали Науково-практичної конференції «Сучасні проблеми фармакології, косметології та аромології» (2019 р., м. Одеса). Одеса, 2019. С.26–30.

16. Bezruk I., Marksa M., Georgiyants V., Ivanauskas L. Determination of amino acids profile in leaves of *Hedera helix* L. collected from different European countries using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Book of abstracts 10th International Pharmaceutical Conference „Science and Practice 2019” November 15th. – Kaunas, Lithuania, 2019. P. 37

17. Безрук І. В., Гриненко В. В., Георгіянц В. А., Іванаускас Л. Визначення впливу кліматичних умов на вміст біологічно активних речовин в листі плюща. «PLANTA+. ДОСЯГНЕННЯ ТА ПЕРСПЕКТИВИ» Матеріали Міжнародної науково-практичної конференції, присвяченої пам'яті доктора хімічних наук, професора Ніни Павлівни Максютіної (до 95-річчя від дня народження) (20-21 лютого 2020 р., м. Київ). – Київ, 2020. С.59-60.

18. Безрук І., Котвіцька А., Корж Ю., Грудько В., Іванаускас Л., Георгіянц В. Порівняння аналітичних та економічних характеристик хроматографічних методик для аналізу препаратів, що містять екстракт плюща. Збірник матеріалів XIV науково-практичної конференції «Управління якістю в фармації» 22.05.2020 (22 травня 2020 р. м. Харків). Харків, 2020. С.12.

19. Безрук І. В. Вишневський І. А., Губарь С. М., Штриголь С.Ю., Георгіянц В.А. фармакологічні та хроматографічні дослідження комбінації рослинного екстракту та селективного агоністу β_2 - адренорецепторів. Матеріали науково-практичної дистанційної конференції з міжнародною участю «сучасні напрямки удосконалення фармацевтичного забезпечення населення: від розробки до використання лікарських засобів природного і синтетичного походження», присвяченої 75-й річниці Університету та 20-й

річниці створення фармацевтичного факультету (19-20 травня 2020 р. м. Івано-Франківськ). – Івано-Франківськ, 2020. С.147.

20. Bezruk I., Kotvitska A., Korzh J., Ivanauskas L., Georgiyants V. Assessment and comparison of chromatographic procedures for hederacoside C determination in dosage form. Book of abstracts international distance conference contemporary pharmacy: issues, challenges and expectation May 8th. – Kaunas, Lithuania, 2020.P. 23.

21. Безрук І. В., Матерієнко А. С., Губарь С. М., Георгіянц В. А. Розробка кількісного визначення гедеракозиду С в складі багатокомпонентного сиропу методом високоефективної рідинної хроматографії. Збірник всеукраїнської науково-практичної конференції «Актуальні питання сучасної медицини і фармації» (до 50-річчя заснування ЗДМУ (18-25 квітня 2018 р., 30 травня 2018 р. м. Запоріжжя). Запоріжжя, 2018. С. 143-144.